

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

11 Publication number:

11 Numéro de publication:

**0 827 552**

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die  
Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

**WO 97/35031** (art.158 des EPÜ).

International application published by the World  
Intellectual Property Organisation under number:

**WO 97/35031** (art.158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation  
Mondiale de la Propriété sous le numéro:

**WO 97/35031** (art.158 de la CBE).



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/35031</b> (43) Date de publication internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00483 (22) Date de dépôt international: 19 mars 1997 (19.03.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/03412                      19 mars 1996 (19.03.96)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DELAIR, Thierry [FR/FR]; Le Coin, F-69700 Echalas (FR). ELAISSARI, Abdelhamid [MA/FR]; 7, rue Jacques-Monod, F-69007 Lyon (FR). CHARLES, Marie-Hélène [FR/FR]; La Lamberte, Chemin du Vernon, F-69420 Condrieu (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCE DETECTION WITH SIGNAL AMPLIFICATION (54) Titre: DETECTION D'UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE AVEC AMPLIFICATION DE SIGNAL (57) Abstract <p>A kit for detecting a nucleotide sequence of interest with signal amplification, containing a labelled nucleotide probe and a reagent essentially including a suspension of particles on which at least one series of oligonucleotide units is immobilised. Each of the series of oligonucleotide units, which are all identical, includes, at least, a nucleotide sequence hybridizable with said sequence of interest and a nucleotide sequence hybridizable with said probe. Said reagent contains more than 10 such oligonucleotide units per particle. The kit is particularly useful for diagnosing genetic diseases or determining pathogens such as bacteria, viruses, fungi or parasites.</p> (57) Abrégé <p>Nécessaire pour la détection d'une séquence nucléotidique d'intérêt, avec amplification de signal, contenant une sonde nucléotidique marquée et un réactif comprenant essentiellement une suspension de particules sur lesquelles est immobilisée au moins une série d'unités oligonucléotidiques, chacune desdites unités oligonucléotidiques de ladite série, toutes identiques, comprenant, au moins, une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite séquence d'intérêt et une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite sonde, ledit réactif contenant plus de 10 desdites unités oligonucléotidiques par particule. Application notamment au diagnostic de maladies génétiques ou à la détermination d'agents pathogènes tels que bactéries, virus, champignons ou parasites.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Détection d'une séquence nucléotidique  
avec amplification de signal

La présente invention a pour objet un réactif et un  
5 procédé pour la détection d'une séquence nucléotidique dans  
un échantillon.

Il est souvent nécessaire de déterminer si un gène,  
une partie de gène ou une séquence nucléotidique particulière  
est présent chez un organisme vivant, dans un extrait cellu-  
10 laire ou dans un échantillon biologique.

La recherche de séquences nucléotidiques spécifiques  
est utilisée notamment pour la détection d'organismes patho-  
gènes, la détermination de la présence d'allèles ou la détec-  
tion de la présence de lésions dans un génome. Des maladies  
15 génétiques telles que la maladie de Huntington, la myopathie  
de Duchenne, la phénylcétonurie et la  $\beta$ -thalassémie peuvent  
être diagnostiquées par le biais de l'analyse de l'ADN des  
individus. De plus, le diagnostic ou l'identification de  
virus, de viroïdes, de bactéries, de champignons ou de para-  
20 sites peut être réalisé par des expériences d'hybridation  
avec des sondes nucléiques.

Différents types de méthodes de détection des acides  
nucléiques sont décrits dans la littérature. Ces méthodes  
reposent sur les propriétés d'appariement purine-pyrimidine  
25 des brins complémentaires d'acides nucléiques dans les duplex  
ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN. Ce processus d'appariement s'ef-  
fectue par l'établissement de liaisons hydrogène entre les  
bases adénosinethymine (A-T) et guanosine-cytosine (G-C) de  
l'ADN double brin. Des paires de bases adénosine-uracile  
30 (A-U) peuvent également se former par liaisons hydrogène dans  
les duplex ADN-ARN ou ARN-ARN. L'appariement de brins d'aci-  
des nucléiques pour la détermination de la présence ou de

l'absence d'une molécule d'acide nucléique donnée est communément appelée par "hybridation d'acides nucléiques" ou simplement "hybridation".

Sur la base des propriétés des acides nucléiques, des techniques ont été développées permettant de mettre en évidence et de quantifier, dans un échantillon à analyser, un acide nucléique appelé cible. Ces techniques, qui sont bien connues, peuvent être divisées en deux grands groupes : les techniques dites de détection directe telles que celle dite de SOUTHERN et la technique dite "Dot-blot" pour la détection d'ADN ou la technique NORTHERN pour la détection d'ARN, et les techniques dites indirectes telles que la technique sandwich ou "Reverse-Dot".

Une des principales difficultés rencontrées lors de la mise au point d'un test pour détecter une séquence nucléotidique cible d'intérêt est le seuil de sensibilité des méthodes d'hybridation, et diverses méthodes ont été décrites afin d'accroître la puissance de détection de ces techniques d'hybridation. Ces méthodes dites "d'amplification" peuvent intervenir à différents stades d'un procédé de détection par sondes nucléiques. On peut distinguer deux catégories : l'amplification de cible ou de signal.

Les techniques d'amplification de cible sont connues. Un inconvénient de ces techniques réside dans la difficulté à quantifier la cible nucléique d'intérêt après l'étape d'amplification.

D'autres approches, concernant l'amplification de signal, ont été décrites. Ainsi, les brevets US-4 731 325 et EP-0 225 807 décrivent des techniques utilisant une pluralité de sondes de détection pouvant s'hybrider sur la cible. Dans beaucoup de cas (nécessité de différencier des espèces proches en bactériologie ou mise en évidence de maladies géné-

tiques), il n'est pas possible d'utiliser cette technique car une seule séquence spécifique sur la cible est utilisable pour hybrider une sonde de détection.

Certaines techniques décrites consistent à augmenter  
5 le nombre des traceurs, c'est-à-dire de molécules capables de générer un signal, directement ou indirectement, sur la sonde de détection. Le traceur peut notamment être une biotine, un fluorophore, une enzyme ou un groupement radioactif. La sonde de détection est greffée à un polymère, qui peut être de  
10 nature nucléotidique, sur lequel sont fixés, le plus souvent par covalence, un nombre de traceurs supérieur à deux (voir par exemple US-4 687 732, EP-0 373 956, WO-88/02784, WO-90/00622, EP-0 292 128, WO-89/03849 et EP-0 173 339).

L'un des inconvénients de ces techniques réside dans  
15 la nécessité de réaliser un couplage contrôlé entre la sonde et le nombre de traceurs. Ce double couplage n'est pas aisé à maîtriser pour avoir un maximum de traceurs pour une sonde de détection. Des systèmes où le traceur est incorporé de manière contrôlée, par exemple au cours de la synthèse auto-  
20 matique d'oligodésoxyribonucléotides, ont été décrits (Piele U. et al., Nucleic Acids Research, 18, 4355-4360 (1990) ou Misiura K. et al., Nucleic Acids Research, 18, 4345-4354 (1990)). Mais dans ce cas, le nombre de traceurs incorporés est faible en raison des limitations inhérentes à la synthèse  
25 sur support solide. De plus, lorsque le nombre de traceurs augmente, la sonde de détection est facilement masquée par les traceurs et le rendement d'hybridation diminue.

Ces mêmes inconvénients se retrouvent dans le système décrit dans le brevet US-4 882 269. Une sonde dite pri-  
30 maire de nature nucléotidique comportant une queue de type polymère quelconque s'hybride sur la cible. Cette queue peut porter un traceur révélabile par une sonde secondaire adaptée.

Dans le cas où la queue est de nature nucléotidique, la sonde secondaire est de nature nucléotidique et peut s'hybrider avec la queue. Pour que le système fonctionne, il faut une queue nucléotidique de grande taille, de séquence différente  
5 de la sonde primaire, et il faut multiplier les sondes secondaires marquées. Cela est réalisé en pratique par des techniques de biologie moléculaire où la sonde primaire est clonée dans un phage et les sondes secondaires sont complémentaires de différentes séquences du phage.

10 Un autre système est décrit dans le brevet EP-0 153 873, dans lequel une partie d'une sonde nucléique dite primaire s'hybride avec la cible. Cette sonde primaire comprend une deuxième partie sur laquelle peut s'hybrider une deuxième sonde multimarquée dite secondaire. Dans la réalisation  
15 pratique, ces sondes primaires sont fabriquées par des techniques de biologie moléculaire comme le clonage (par exemple clonage d'une séquence spécifique de la cible dans un fragment de phage M13) qui sont peu adaptées à des processus de fabrication à grande échelle.

20 Le document EP-0 204 510 décrit un procédé dans lequel la cible nucléique est mise en contact avec une première sonde appelée sonde réceptrice, une deuxième sonde appelée sonde amplificatrice et une troisième sonde, appelée sonde marquée, capable de s'hybrider avec la deuxième sonde ampli-  
25 ficatrice. La sonde réceptrice qui s'hybride avec la cible possède une queue nucléotidique homopolymère (par exemple polyA). La sonde amplificatrice contient une séquence complémentaire de la queue (par exemple polyT). La sonde de marquage contient une séquence nucléotidique capable de  
30 s'hybrider avec la sonde amplificatrice (par exemple polyA marquée). Cette combinaison de sondes constitue un empilement conduisant à une amplification de signal. Un autre type

d'empilement est décrit dans le brevet EP-0 450 594. Dans ces deux cas, les empilements qui se produisent dans le milieu d'hybridation ne sont pas contrôlés et conduisent à une mauvaise reproductibilité et donc à des problèmes de quantification. De plus la multiplication d'étapes successives d'hybridation entraîne des pertes qui entraînent un gain médiocre en amplification de signal.

Dans le brevet FR-2 710 075, on a décrit l'utilisation d'un copolymère sur lequel sont greffées plusieurs unités oligonucléotidiques complémentaires d'une sonde de détection marquée et aussi complémentaires de la cible. Cependant, les polymères ont tendance à former des agrégats nuisant à l'homogénéité des résultats.

On a maintenant trouvé un système de détection ne présentant pas les inconvénients précités.

L'invention a pour objet un nécessaire (encore appelé "kit") pour la détection d'une séquence nucléotidique d'intérêt à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée, avec amplification de signal, caractérisé par le fait qu'il contient, dans des conteneurs appropriés, ladite sonde nucléotidique, marquée avec un traceur, et un réactif comprenant essentiellement une suspension de particules sur lesquelles est immobilisée au moins une série d'unités oligonucléotidiques, chacune desdites unités oligonucléotidiques de ladite série, toutes identiques, comprenant, au moins, une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite séquence d'intérêt et une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite sonde, ledit réactif contenant plus de 10, et en particulier plus de 50, desdites unités oligonucléotidiques de ladite série par particule.

Bien entendu, le nombre d'unités nucléotidiques donné ici est un nombre moyen d'unités nucléotidiques par



particule.

Par exemple, le réactif utilisé dans le kit de l'invention peut comprendre, en moyenne, de 100 à 1000 desdites unités oligonucléotidiques d'une même série par particule.

5           La suspension de particules est également appelée "latex". On appelle ici latex une suspension de particules de polymère, naturel ou synthétique, dans un milieu liquide, notamment un milieu aqueux, les particules étant insolubles dans ledit milieu et ayant des dimensions inférieures à  
10   10  $\mu\text{m}$ .

Les particules du latex utilisables dans la réalisation du réactif peuvent être des produits commerciaux ou peuvent être préparées de façon connue, notamment par polymérisation en émulsion, en suspension, en dispersion, ou par  
15 précipitation ; voir par exemple R. Arshady, Colloid Polym. Sci. 270:717-732 (1992) et le brevet FR-2 676 451. Ces particules peuvent porter des fonctions réactives telles que par exemple des groupements thiol, amine ou carbonyle (notamment aldéhyde) ; des groupements acide carboxylique, des groupe-  
20 ments acide carboxylique activés, notamment sous forme de chlorure d'acide, d'anhydride, d'anhydride mixte, d'ester (ester de N-hydroxysuccinimide, ester de p-nitrophényle, etc.) ; des groupements hydroxyle et leurs dérivés (tosylates, mésylates, etc.) ; des groupements halogénés ;  
25 des doubles liaisons activées (par exemple divinylsulfone ; des groupements carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturés, etc.). Le matériau polymère constituant les particules peut être issu notamment de monomères choisis parmi les dérivés de type vinylique tels que le styrène, les dérivés acryliques (acides acrylique et  
30 méthacrylique, acrylamides et méthacrylamides, esters acryliques et méthacryliques), les alcools, esters et éthers vinyliques, etc.).

Les particules, qui sont de préférence de taille homogène, ont par exemple des dimensions pouvant aller de 50 nm à 5  $\mu$ m, et en particulier de 100 à 1000 nm.

Le terme "unité oligonucléotidique" tel qu'utilisé  
5 dans la présente demande, désigne un oligonucléotide constitué par un enchaînement d'au moins 5 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée telle que l'inosine, la méthyl-  
10 5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Cet oligonucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkyl-phosphonates, au  
15 niveau du squelette comme par exemple les  $\alpha$ -oligonucléotides (FR-2 607 507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., (1992), 114, 1895-1897). Ces diverses modifications peuvent éventuellement être prises en combinaison.

20 La séquence d'intérêt est notamment une séquence nucléotidique simple brin, éventuellement obtenue par dénaturation préalable d'un hybride (ADN-ADN, ADN-ARN ou ARN-ARN) selon les techniques classiques (physiques, chimiques ou enzymatiques). Le système d'amplification de signal de l'in-  
25 vention peut également servir à la détection d'une séquence double brin, en opérant selon la technique de la triple hélice à laquelle il peut s'appliquer.

Les traceurs utilisés pour marquer la sonde de détection sont choisis parmi les traceurs usuels. Ce sont par  
30 exemple :

- des enzymes qui sont aptes à produire un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, ou lu-

minescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, etc. ;

- des chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants ;

- des groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, ou les mesures d'impédance ;

- des groupements détectables par des méthodes optiques (comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact) ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel ;

- des molécules radioactives comme le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou le  $^{125}\text{I}$ .

Les méthodes covalentes ou non covalentes pour attacher ces traceurs dépendent du type de traceur et sont bien connues.

Des systèmes indirects peuvent aussi être utilisés, par exemple, ceux comprenant les haptènes, détectables par un anticorps spécifique, ou une protéine comme le couple biotine-avidine ou biotine-streptavidine, ou encore un couple sucre/lectine. Dans ce cas c'est l'anticorps ou la protéine qui porte un traceur.

Les acides nucléiques hybrides de type ADN/ADN, ARN/ARN, ADN/ARN, peuvent être détectés par des anticorps antihybrides, ou par des protéines spécifiques comme les polymérases phagiques.

Si la sonde de détection est constituée de nucléotides modifiés comme les nucléotides d'anométrie alpha ou les PNA (P.E NIELSEN et al., Science, 254,1497-1500 (1991)), des

anticorps anti-alphanucléotides ou anti-PNA peuvent être utilisés.

Selon un premier mode de réalisation, le réactif utilisé selon l'invention est caractérisé par le fait que, dans une même unité oligonucléotidique, lesdites séquences capables d'hybridation sont distinctes et non chevauchantes. Dans un tel cas, la séquence de la sonde marquée peut être choisie arbitrairement, et ladite séquence oligonucléotidique capable d'hybridation avec la sonde est alors une séquence complémentaire de celle de la sonde.

Dans un système utilisant un tel réactif, la sonde marquée peut donc être utilisée comme sonde de détection universelle. En outre, un tel système convient plus particulièrement pour effectuer la détection en une seule étape, notamment sans lavage(s) intermédiaire(s).

Dans un autre mode de réalisation, le réactif utilisé selon l'invention est caractérisé par le fait que dans une même unité oligonucléotidique, l'une desdites séquences capables d'hybridation est incluse dans l'autre. Autrement dit, l'une desdites séquences est constituée par une partie de l'autre séquence, ou bien, à la limite, les deux séquences sont confondues (elles sont identiques) et, en fait, n'en font qu'une, dans l'unité oligonucléotidique. Dans ce mode de réalisation, la sonde marquée doit évidemment être adaptée à la cible (séquence d'intérêt) : ou bien la sonde est identique à la séquence d'intérêt, ou bien la sonde doit au moins être homologue de la séquence d'intérêt, c'est-à-dire être capable de s'hybrider avec la séquence complémentaire de la séquence d'intérêt.

Généralement, le réactif utilisé selon l'invention contient quelques centaines d'unités oligonucléotidiques d'une même série (toutes identiques), notamment de 100 à 1000

unités oligonucléotidiques, telles que définies ci-dessus, par particule. Ce réactif est également appelé ici "conjugué de détection".

Les unités oligonucléotidiques présentes dans le  
5 réactif d'amplification de l'invention sont généralement des oligonucléotides ayant une longueur de 5 à 100 nucléotides et en particulier de 10 à 40 nucléotides.

Les unités oligonucléotidiques sont immobilisées sur les particules du latex selon les méthodes connues, par exemple  
10 par adsorption, par interaction hydrophobe, par interaction ionique, ou par établissement de liaisons hydrogène, ou encore par couplage de façon à établir une liaison covalente avec les particules, éventuellement par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

15 Le couplage d'unités oligonucléotidiques avec les particules du latex peut être effectué selon l'une des méthodes suivantes. Par exemple, dans le cas d'une méthode directe, on synthétise un oligonucléotide ayant une fonction réactive à un endroit quelconque de la chaîne nucléotidique,  
20 comme par exemple à l'extrémité 5' ou à l'extrémité 3', ou sur une base nucléotidique ou sur un phosphate internucléotidique, ou encore sur la position 2' du sucre nucléotidique. L'oligonucléotide est ensuite couplé aux particules du latex préparées au préalable et comportant une fonction réactive  
25 complémentaire de celle de l'oligonucléotide, c'est-à-dire telle que la réaction des deux fonctions réactives entre elles permet l'établissement d'une liaison covalente entre l'oligonucléotide et une particule. A titre d'exemples de couples de fonctions réactives, on peut coupler des amines  
30 primaires avec un acide carboxylique activé, un aldéhyde, un isocyanate, un isothiocyanate ou une double liaison activée par au moins un carbonyle, par une sulfone, par un groupement

sulfoxyde ou par un nitrile ; ou bien une fonction thiol avec un halogénoalkyle ou avec un dérivé à double liaison carbone-carbone activée.

Dans une méthode de couplage indirect, l'oligonu-  
5 cléotide et les particules sont chacun porteurs d'une fonction réactive, ces fonctions réactives pouvant être identiques ou différentes l'une de l'autre, ces deux fonctions n'étant pas complémentaires, mais étant capables de réagir avec un agent intermédiaire de couplage qui est un réactif  
10 bifonctionnel pouvant éventuellement jouer le rôle de bras espaceur. Cet agent est dit homobifonctionnel si les deux fonctions sont identiques et hétérobifonctionnel si les deux fonctions sont différentes. Parmi les agents de couplage homobifonctionnels, on peut citer le DITC (phénylène-  
15 1,4-diisothiocyanate), le DSS (disuccinimidylsubérate) ou analogues lorsque les deux fonctions réactives sont des fonctions amines primaires. Parmi les agents de couplage hétérobifonctionnels, on peut citer le SMCC (succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate) lorsque les  
20 deux fonctions réactives présentent chacune indépendamment de l'autre une fonction amine primaire et une fonction thiol, le SMPB (succinimide-4-(p-maléimido phényle) butyrate) ou analogues.

Après le couplage de l'oligonucléotide avec les  
25 particules, l'excès éventuel de fonctions réactives sur les particules peut être neutralisé, le cas échéant, de façon connue en soi. Par exemple, les groupements aldéhyde en excès peuvent être neutralisés par une amine primaire telle que l'éthanolamine (et inversement), les groupements maléimide  
30 peuvent être neutralisés par un thiol (tel que la thioéthanolamine ou le dithiothréitol), etc.

On peut immobiliser de la même façon, sur des particules couplées à une première série d'unités oligonucléotidiques toutes identiques, au moins une seconde série d'unités oligonucléotidiques toutes identiques mais différentes de celles de la première série. Par exemple, les unités oligonucléotidiques de la seconde série comprennent une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec une seconde séquence d'intérêt différente de la séquence d'intérêt reconnue par les unités oligonucléotidiques de la première série.

10 L'invention concerne également l'utilisation d'un réactif, constitué par le conjugué de détection tel que défini précédemment, comme réactif d'amplification de signal dans un procédé de détection d'une séquence nucléotidique d'intérêt.

15 La séquence d'intérêt est soit une séquence de la substance cible (celle que l'on veut détecter effectivement), soit une séquence liée à la substance cible, soit encore (dans des méthodes de compétition) une séquence liée à un analogue de la substance-cible, compétiteur de celle-ci.

20 L'invention concerne notamment un procédé de détection, avec amplification de signal d'une séquence nucléotidique d'intérêt susceptible d'être immobilisée sur un support solide, dans lequel on utilise une sonde nucléotidique de détection marquée avec un traceur, caractérisé par le fait que  
25 l'on ajoute à un milieu liquide en contact avec ledit support solide, dans des conditions permettant l'hybridation :

- un réactif tel que défini ci-dessus,
- et la sonde de détection marquée,

puis on révèle selon les méthodes usuelles la présence éventuelle du traceur immobilisé sur le support solide.

30 Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un oli-

gonucléotide pour une utilisation dans des tests diagnostiques, en chromatographie d'affinité et dans des processus de séparation. Des matériaux naturels ou de synthèse, modifiés ou non chimiquement peuvent être utilisés comme support  
5 solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, du dextran ; des polymères tels que polychlorures de vinyle, polyéthylènes, polystyrènes, polyacrylates, poly-  
10 amides, ou copolymères à base de monomères vinyl aromatiques, alkylesters d'acides  $\alpha$ - $\beta$  insaturés, esters d'acides carboxyliques insaturés, chlorure de vinylidène, diènes ou composés présentant des fonctions nitrile (comme acrylonitrile) ; des polymères de chlorure de vinyle et de propylène ; des polymères  
15 de chlorure de vinyle et d'acétate de vinyle ; des copolymères à base de styrènes ou dérivés substitués du styrène ; des fibres naturelles telles que le coton et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux inorganiques tels que la silice, le verre, une céramique, le quartz. Le  
20 choix d'un matériau de support, dans chaque cas particulier, peut être effectué à partir de simples expériences de routine.

Le support solide utilisé dans la présente invention est notamment un polymère de polystyrène, un copolymère  
25 butadiène-styrène ou un copolymère butadiène-styrène en mélange avec un ou plusieurs polymères ou copolymères choisis parmi le polystyrène, les copolymères styrène-acrylonitrile ou styrène-méthylméthacrylate de méthyle, les polypropylènes, les polycarbonates ou analogues. Le support solide utilisé  
30 est notamment un polystyrène ou un copolymère à base de styrène comprenant entre environ 10 et 90 % en poids de motifs styrène.



Le support solide utilisé peut être, sous les formes usuelles appropriées, par exemple, sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une feuille, d'un cône, d'un tube, d'un puits, de billes ou analogues.

5           Le procédé de l'invention peut servir à la détection et/ou au dosage d'un fragment d'acide nucléique cible susceptible d'être présent dans un échantillon, notamment dans les cas déjà mentionnés dans l'introduction de la présente demande : diagnostic de maladies génétiques, identifications  
10 d'agents pathogènes tels que bactéries, virus, champignons, ou parasites, etc. La séquence nucléotidique d'intérêt est une partie déterminée de la séquence nucléotidique de la cible, qui peut être choisie, notamment, comme moyen de caractérisation d'une espèce, d'un genre, d'un allèle ou ana-  
15 logues. La séquence nucléotidique d'intérêt est fixée sur le support solide directement ou indirectement par l'intermédiaire d'un ligand. Le ligand peut notamment être une sonde de capture choisie pour être complémentaire d'une autre région de la cible, selon la technique sandwich, qui est bien  
20 connue. Dans un autre mode de réalisation de la technique sandwich, la sonde de capture est elle-même greffée sur un copolymère immobilisée ou immobilisable sur le support solide, par exemple par adsorption passive, c'est-à-dire sans formation d'une liaison covalente entre le support et le  
25 copolymère portant la sonde de capture. Cette méthode peut contribuer à réduire le bruit de fond. La séquence d'intérêt peut également être fixée directement sur le support solide par l'intermédiaire de la cible selon la technique "Reverse-Dot".

30           Le procédé de l'invention est également applicable aux immunoessais et notamment à la détection d'haptènes, d'antigènes, de polypeptides ou d'anticorps, dans des proces-

sus avec ou sans compétition. Par exemple, un oligonucléotide peut être greffé, par liaison covalente de préférence, à un ligand susceptible de réagir spécifiquement avec une molécule cible. Cet oligonucléotide joue alors le rôle de la "séquence d'intérêt". Dans les techniques de compétition, l'oligonu-  
5 cléotide peut être greffé, de préférence par covalence, à un ligand, ledit ligand étant susceptible d'entrer en compétition avec la cible pour sa fixation à un anti-ligand spécifique. Les techniques de couplage entre un ligand et l'oligonu-  
10 cléotide dépendent de la nature du ligand et sont bien connues. Il est évidemment nécessaire de choisir une méthode de couplage qui n'altère pas la capacité du ligand à reconnaître l'anti-ligand, ce qui peut être facilement vérifié par de simples expériences de routine.

15 Le terme "anticorps" désigne notamment les anticorps monoclonaux ou polyclonaux, les fragments d'anticorps et les anticorps obtenus par recombinaison génétique.

Le terme "haptène" désigne une molécule de taille insuffisante pour être immunogène, mais qui par couplage avec  
20 une protéine, par exemple, permet par immunisation d'animaux l'obtention d'anticorps reconnaissant ladite molécule.

A titre illustratif, si la cible à doser est un antigène, la séquence d'intérêt (c'est-à-dire l'oligonucléotide) est greffée sur un anticorps spécifique de l'antigène.  
25 Cet anticorps, après réaction avec l'antigène, peut réagir par l'intermédiaire de la séquence d'intérêt pour former un complexe avec le réactif oligonucléotides-latex. L'unité oligonucléotidique greffée sur les particules de latex comprend une séquence complémentaire d'au moins une partie de la  
30 séquence d'intérêt. Avec une sonde de détection marquée, on peut ainsi révéler l'antigène avec une bonne sensibilité, grâce à l'amplification du signal.

Si l'unité oligonucléotidique du réactif comprend une séquence spécifique de la séquence d'intérêt et une autre séquence, cette autre séquence sera complémentaire de la séquence, arbitraire, de la sonde. Une réduction du nombre d'étapes est possible en utilisant un tampon approprié permettant à la fois la réaction du ligand sur l'anti-ligand et l'hybridation des séquences nucléotidiques entre elles. Un essai en une étape est réalisable, l'anticorps étant greffé à la séquence d'intérêt, le réactif de détection latex-oligonucléotides et la sonde de détection réagissant pendant la même incubation.

Dans le dessin annexé, la figure unique est un graphe représentant la variation du signal avec amplification (-♦-) et sans amplification (-□-) dans l'essai décrit à l'exemple 2 ci-après. En abscisse est portée la quantité de copies d'ADN cible, exprimée en puissances de 10, et en ordonnée le signal exprimé en unités relatives de fluorescence (URF).

Les exemples suivants illustrent l'invention. Dans ces exemples, les séquences nucléotidiques utilisées sont les suivantes :

- séquence 3059 :

TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAG

- séquence 2908 :

AACGCTACTACTATTAG

- séquence 3057 :

CTACTAATAGTAGTAGCGTT

EXEMPLESEXEMPLE 1 :   Couplage d'un l'oligonucléotide  
avec des particules de latex

5

On effectue préalablement une activation de l'oligonucléotide 2908 avec du phénylène-diisothiocyanate dans les conditions suivantes : 30 nanomoles d'oligonucléotide sont mis en solution dans 25 µl de tampon borate de sodium 0,1 M  
10 pH 9,3 auquel on ajoute 60 µl d'une solution de phénylène-diisothiocyanate (DITC) dans le diméthyl-formamide à 30 g/L. Après 2 heures d'incubation à 37°C, on extrait par le butanol le DITC n'ayant pas réagi, puis on recueille la phase aqueuse et l'évapore à sec sous pression réduite. On obtient ainsi  
15 l'oligonucléotide 2908 activé.

Dans un tampon carbonate de sodium 0,1 M, pH 9,3 contenant l'oligonucléotide 2908 activé, on ajoute un latex, de façon à obtenir une suspension contenant 1 % en poids de particules et 100 µg d'oligonucléotide 2908 par ml.

20 Le latex a été obtenu de façon analogue à celle décrite dans l'exemple 1 du brevet FR-2 676 451, au départ d'un mélange de styrène et de chlorhydrate d'aminométhyl styrène, contenant 1 % en poids de ce dernier (qui est lui-même un mélange 60:40, en moles, des isomères para et méta). Les  
25 particules ont des dimensions moyennes de l'ordre de 430 nm.

Après 15 heures sous agitation, on soumet à une centrifugation et le culot de centrifugation est repris dans un tampon glycine 0,1 M NaCl 0,15 M, pH 8,2.

Le rendement de couplage est déterminé en dosant (en  
30 UV à 280 nm) la quantité d'oligonucléotides résiduels dans le surnageant après centrifugation du latex. Ce rendement est de l'ordre de 70 %.

EXEMPLE 2 :

Détection d'un fragment d'acide nucléique du virus  
5 de l'hépatite B par protocole sandwich sur automate VIDAS en  
utilisant pour la détection des oligonucléotides couplés à  
des particules de latex, obtenus à l'exemple 1 ci-dessus.

Le protocole suivant est effectué automatiquement  
sur l'automate VIDAS<sup>®</sup> commercialisé par la société  
10 bioMérieux-Vitek.

La réaction est conduite dans un support conique  
appelé SPR ("Solid Phase Receptacle"), réalisé à partir d'un  
matériau vendu sous la dénomination "K résine" (copolymère  
butadiène-styrène) et commercialisé par la société  
15 bioMérieux-Vitek (USA). Les divers réactifs sont disposés  
dans les différents puits d'une barrette et les étapes suc-  
cessives se déroulent dans le SPR qui fait office de pipette.  
La réaction d'hybridation sandwich décrite dans le protocole  
ci-dessous se produit sur la paroi interne du cône.

20 Sur la surface interne du SPR, est fixé passivement  
oligonucléotide 3059 (spécifique de l'ADN du virus de l'hépa-  
tite B) couplé à un copolymère (décrit à l'exemple 1 de  
FR-2 710 075). La concentration utilisée est de 0,15 nmole/ml  
d'oligonucléotides dans un volume de 300 µL d'une solution de  
25 PBS 4x (phosphate de Sodium 200 mM pH 7,0, NaCl 600 mM).  
Après 18 heures à température ambiante, ou deux heures à  
37°C, les cônes sont lavés 2 fois par une solution de PBS  
Tween, puis séchés sous vide.

La barrette contient l'ensemble des réactifs néces-  
30 saires à la détection, dans des puits indépendants, c'est-à-  
dire :

- puits 2 : 100 µl d'une solution à 0,015 nmoles/ml

oligonucléotide 2908 lié aux particules de latex, dans un tampon PEG (phosphate de sodium 150 mM, NaCl 450 mM, pH 7 + ADN de sperme de saumon 0,14 mg/ml (Sigma D 9156) + 20 g/l de PEG 4000 (Merck 807490) + 6,5 g/l de Tween 20 (Biorad 170-5 6531)),

- puits 3 : 200  $\mu$ l d'une solution à 0,045 nmoles/ml dans le tampon PEG de la sonde de détection. La sonde de détection est l'oligonucléotide 3057, couplé à la phosphatase alcaline comme décrit dans WO-91/19812.

10 - puits 4 et 5 : 2 fois 600  $\mu$ l de solution de lavage PBS Tween,

- puits 6 : 300  $\mu$ l de substrat MUP (méthyl-4 umbelliféryl phosphate) en solution dans un tampon diéthanamine.

15 Dans le premier puits (puits 1) de la barrette, sont déposés 200  $\mu$ l de la solution de cible dans un tampon PEG. Après mélange, reconstitué dans le puits 2, de la cible (110  $\mu$ l du puits 1), de la sonde de détection et du conjugué oligonucléotide-latex pour l'amplification (110  $\mu$ l du puits  
20 3), et incubation pendant 45 minutes du cône contenant ledit mélange, le cône est lavé 2 fois par une solution de PBS Tween. 250  $\mu$ l de substrat sont aspirés dans le cône pendant 15 minutes, puis relâchés dans une cuvette de lecture. L'appareil mesure le signal fluorescent exprimé en URF (unités  
25 relatives de fluorescence).

A titre de comparaison, on a réalisé un essai analogue, mais en omettant l'addition du conjugué 2908-latex dans le puits n° 2.

Les résultats sont représentés à la figure 1.

### REVENDICATIONS

1. Nécessaire pour la détection d'une séquence nucléotidique d'intérêt à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée, avec amplification de signal, caractérisé par le fait qu'il contient, dans des conteneurs appropriés, ladite sonde nucléotidique, marquée avec un traceur, et un réactif comprenant essentiellement une suspension de particules sur lesquelles est immobilisée au moins une série d'unités oligonucléotidiques, chacune desdites unités oligonucléotidiques de ladite série, toutes identiques, comprenant, au moins, une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite séquence d'intérêt et une séquence nucléotidique capable d'hybridation avec ladite sonde, ledit réactif contenant plus de 10 desdites unités oligonucléotidiques de ladite série par particule.

2. Nécessaire selon la revendication 1, caractérisé par le fait que, dans une même unité oligonucléotidique, lesdites séquences capables d'hybridation sont distinctes et non chevauchantes.

3. Nécessaire selon la revendication 1, caractérisé par le fait que, dans une même unité oligonucléotidique, l'une desdites séquences capables d'hybridation est incluse dans l'autre.

4. Nécessaire selon la revendication 3, caractérisé par le fait que, dans une même unité oligonucléotidique, lesdites séquences capables d'hybridation sont identiques.

5. Nécessaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ledit réactif contient en moyenne de 100 à 1000 desdites unités oligonucléotidiques par particule.

6. Nécessaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que lesdites particules ont des dimensions inférieures à 10  $\mu\text{m}$ .

7. Nécessaire selon la revendication 6, caractérisé  
5 par le fait que lesdites particules ont des dimensions pouvant aller de 50 nm à 5  $\mu\text{m}$  et en particulier de 100 nm à 1000 nm.

8. Procédé de détection, avec amplification de signal, d'une séquence nucléotidique d'intérêt susceptible  
10 d'être immobilisée sur un support solide, dans lequel on utilise une sonde nucléotidique de détection marquée avec un traceur, caractérisé par le fait que l'on ajoute à un milieu liquide en contact avec ledit support solide, dans des conditions permettant l'hybridation :

15 - un réactif tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes,

- et la sonde de détection marquée, puis on révèle selon les méthodes usuelles la présence éventuelle du traceur immobilisé sur le support solide.

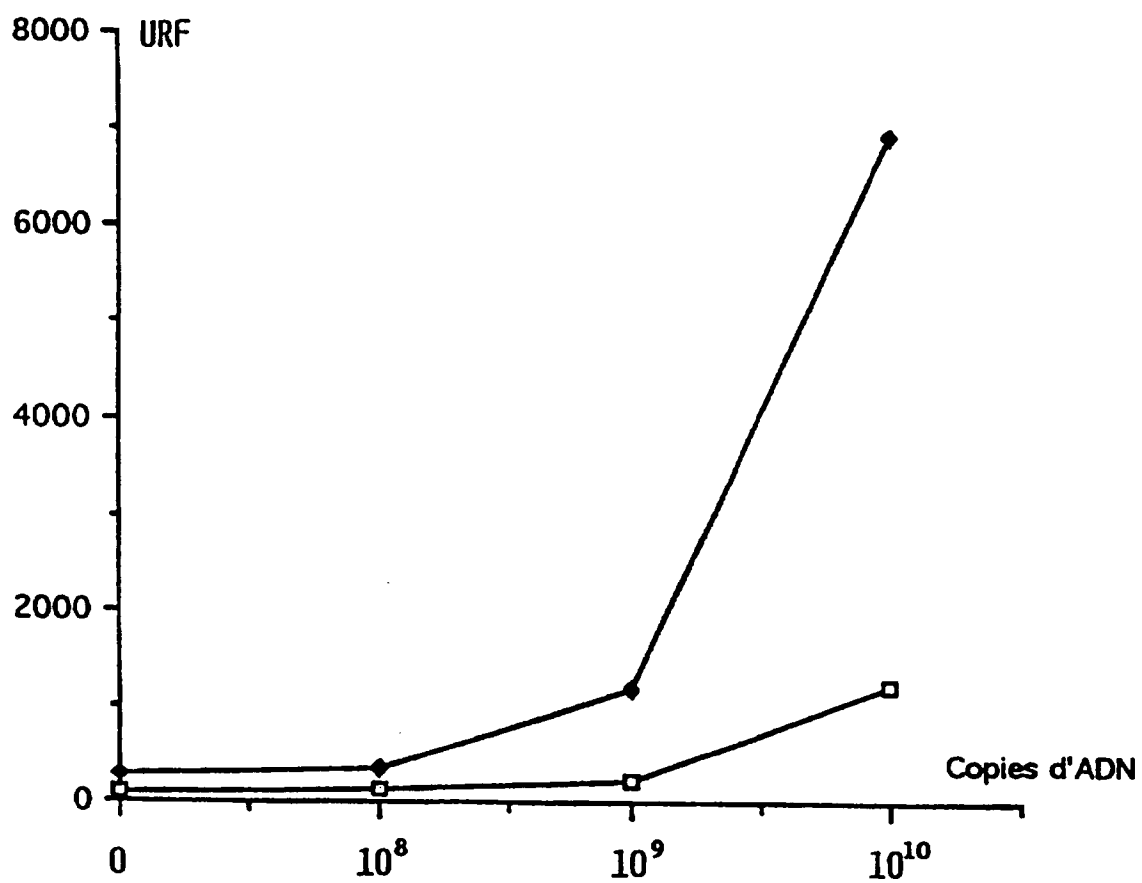
20 9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on ajoute le réactif et la sonde simultanément, c'est-à-dire sans étape de lavage intermédiaire.

25 10. Utilisation d'un réactif tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, comme réactif d'amplification de signal dans un procédé de détection d'une séquence nucléotidique d'intérêt.



- 1/1 -

FIGURE 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00483

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 159 719 A (ENZO BIOCHEM, INC.) 30 October 1985 see page 6, line 1 - line 29 see page 9, line 31 - page 12, line 14 see page 18, line 5 - page 20, line 30 see figure 1	1
A	---	2-4,8-10
Y	WO 95 08000 A (BIO MERIEUX) 23 March 1995 see the whole document	1
A	& FR 2 710 075 A cited in the application	2,3,8-10
A	---	1,5-7
	WO 94 00600 A (MICROPROBE CORPORATION) 6 January 1994 see page 3, line 1 - page 19, line 14 ---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 1997

Date of mailing of the international search report

23.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/00483

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EP 0 647 719 A (NIPPON GENE KK) 12 April 1995</p> <p>-----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00483

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0159719 A	30-10-85	AU 4148685 A	30-01-86
		AU 4598489 A	29-03-90
		CA 1260372 A	26-09-89
		DE 3587427 A	05-08-93
		DE 3587427 T	20-01-94
		EP 0526912 A	10-02-93
		JP 8336400 A	24-12-96
		JP 2560003 B	04-12-96
		JP 60237361 A	26-11-85
		US 4894325 A	16-01-90
		US 5288609 A	22-02-94
-----			
WO 9508000 A	23-03-95	FR 2710075 A	24-03-95
		CA 2149315 A	23-03-95
		EP 0669991 A	06-09-95
-----			
WO 9400600 A	06-01-94	AU 4544193 A	24-01-94
-----			
EP 0647719 A	12-04-95	WO 9421819 A	29-09-94
		JP 5260972 A	12-10-93
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No  
PCT/FR 97/00483

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 159 719 A (ENZO BIOCHEM, INC.) 30 Octobre 1985 voir page 6, ligne 1 - ligne 29 voir page 9, ligne 31 - page 12, ligne 14 voir page 18, ligne 5 - page 20, ligne 30 voir figure 1	1
A	---	2-4,8-10
Y	WO 95 08000 A (BIO MERIEUX) 23 Mars 1995	1
A	voir le document en entier & FR 2 710 075 A cité dans la demande	2,3,8-10
A	---	1,5-7
	WO 94 00600 A (MICROPROBE CORPORATION) 6 Janvier 1994 voir page 3, ligne 1 - page 19, ligne 14 ---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23.06.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No

PCT/FR 97/00483

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 647 719 A (NIPPON GENE KK) 12 Avril 1995 -----	1

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dern. . Internationale No

PCT/FR 97/00483

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0159719 A	30-10-85	AU 4148685 A	30-01-86
		AU 4598489 A	29-03-90
		CA 1260372 A	26-09-89
		DE 3587427 A	05-08-93
		DE 3587427 T	20-01-94
		EP 0526912 A	10-02-93
		JP 8336400 A	24-12-96
		JP 2560003 B	04-12-96
		JP 60237361 A	26-11-85
		US 4894325 A	16-01-90
		US 5288609 A	22-02-94
-----			
WO 9508000 A	23-03-95	FR 2710075 A	24-03-95
		CA 2149315 A	23-03-95
		EP 0669991 A	06-09-95
-----			
WO 9400600 A	06-01-94	AU 4544193 A	24-01-94
-----			
EP 0647719 A	12-04-95	WO 9421819 A	29-09-94
		JP 5260972 A	12-10-93
-----			